

ETUDES SUR LA REPLICATION DE L'ADN DU VIRUS POLYOME

THESE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade
de docteur ès sciences, mention biologique

par

Thomas SEEBECK

de

Starrkirch-Wil (Soleure)

1973

Des copies en microfilm du texte complet peuvent être obtenues
auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève.
Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à
la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse No 1625

GENEVE

Imprimerie de la Section de Physique

1975

ETUDES SUR LA REPLICATION DE L'ADN DU VIRUS POLYOME

THESE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade
de docteur ès sciences, mention biologique

par

Thomas SEEBECK

de

Starrkirch-Wil (Soleure)

Des copies en microfilm du texte complet peuvent être obtenues
auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève.
Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à
la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse No 1625

GENEVE

Imprimerie de la Section de Physique

1975

La Faculté des Sciences, sur le préavis du professeur R. WEIL,
Département de Biologie moléculaire, directeur de thèse, et du
Prof. B. HIRT (Institut Suisse de Recherches Expérimentales sur
le Cancer, Lausanne), autorise l'impression de la présente thèse,
sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, juillet 1973

Le Doyen:

Thèse No 1625

Jean MULLER



R E M E R C I E M E N T S

Les recherches présentées dans ce travail ont été effectuées sous la direction du professeur R. Weil, au Département de Biologie Moléculaire de l'Université de Genève.

J'exprime ici ma profonde reconnaissance au professeur R. Weil et au docteur H. Türlér, dont l'expérience et les encouragements m'ont beaucoup profité au cours de ces recherches.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545902_0039

I N T R O D U C T I O N

Il y a une quinzaine d'années les virus oncogènes ne présentaient pas d'autre intérêt que celui de provoquer des tumeurs chez les rongeurs utilisés au laboratoire. Depuis lors, ils se sont montrés des "outils" de valeur pour la biologie cellulaire moderne, grâce à la petite dimension de leur génome et au fait que leurs activités biologiques sont pour une grande partie, dépendantes du métabolisme de la cellule hôte. Ils offrent ainsi au biologiste, luttant avec des centaines de milliers de gènes inconnus, tous liés par des systèmes de contrôle extrêmement complexes, un moyen relativement simple pour analyser les mécanismes de régulation, p. ex. celui de la mitose de la cellule mammifère.

L E P O L Y O M E

Le virus polyome, découvert en 1958 (13,14), appartient à un groupe de petits virus dont l'ADN à double chaîne est sous forme circulaire, entouré d'une capsidie protéique de forme icosahédrique. Ces virus induisent la formation de tumeurs solides ou de verrues chez divers mammifères.

Le polyome est endémique chez la souris, mais il peut aussi provoquer des tumeurs dans d'autres espèces de rongeurs comme le rat, le cobaye, le lapin et le hamster. Il est de même capable d'infecter des cellules en culture de tissus provenant de diverses espèces de rongeurs. Deux différents types d'infection peuvent avoir lieu selon la cellule hôte:

(A) Infection lytique (49): L'infection lytique de cellules "permissives" comme des fibroblastes ou des cellules épithéliales de souris, conduit d'abord à la production de progéniture virale, suivie par la destruction de la cellule hôte.

(B) Infection abortive: L'infection de cellules "non-permissives" comme des fibroblastes de rat ou de hamster n'aboutit qu'à l'expression des fonctions virales précoces (ARN viral précoce, antigène T), mais elle ne permet pas la réplication de l'ADN viral ou l'expression des fonctions virales tardives (ARN viral tardif, protéines de la capsidie). L'infection abortive est étroitement liée à l'apparition, en culture de tissus, de cellules "transformées" ou à la production de tumeurs dans l'animal intact.

Seule l'infection lytique sera considérée dans ce travail.

LA STRUCTURE DU VIRUS POLYOME

A. La capside

La particule virale est caractérisée par une capside protéique de forme icosahédrique; son diamètre est d'environ $450 \text{ \AA}$. La capside est composée de 72 sous-unités structurales (capsomères), dont 60 hexons et 12 pentons (7, 29). Les capsomères du polyome peuvent être isolés après dégradation alcaline (pH 9 à 11) de la particule virale (19, 37).

L'analyse par électrophorèse en gels d'acrylamide des protéines composant le virus révèle la présence de 6 (23, 38) ou 7 (9, 19) chaînes polypeptidiques différentes dont l'une, de poids moléculaire d'environ 45'000 daltons (PV I) représente 85 - 90 % de la masse protéique totale. Deux autres polypeptiques, de poids moléculaires de 35'000 (PV II) et de 27'000 (PV III) daltons constituent, avec PV I, les capsomères de la particule virale. Enfin, 3 (19, 23, 38) ou 4 (9) polypeptides (PV IV - VII) de poids moléculaires entre 14'000 et 19'000 daltons représentent apparemment des histones de la cellule hôte (18, 23). Ces derniers polypeptides sont localisés à l'intérieur de la particule virale et sont étroitement liés à l'ADN viral (19, 37).

B. Le matériel génétique du polyome (voir schéma 1)

Le matériel génétique du polyome est un ADN à double chaîne circulaire d'environ 1.5 μm de long et dont le poids moléculaire est de 3×10^6 daltons (34, 44, 52). Il existe sous deux formes (I et II) toutes deux infectieuses (10, 11, 53, 54) et contenant donc toute l'information nécessaire pour la production de progéniture virale et pour l'induction de tumeurs:

(I) La forme I est une molécule circulaire superhélicoïdale (12, 45, 46, 52) qui a un coefficient de sédimentation de 20 S. Dans cette configuration toutes les liaisons phosphodiesteriques sont fermées par covalence. L'ADN viral extrait de virions consiste surtout en forme I.

(II) La forme I peut être convertie en forme II par la scission d'une liaison phosphodiesterique, à la suite de laquelle la molécule se déroule et forme un cercle ouvert, dont une chaîne reste circulaire tandis que l'autre contient une interruption. L'ADN viral sous forme II a un coefficient de sédimentation de 16 S.

Bien que les deux formes de l'ADN viral soient infectieuses et de même poids moléculaire, le comportement physico-chimique des deux formes est entièrement différent: Dans des conditions de dénaturation (p. ex. pH supérieur à 12.8), les deux chaînes complémentaires de la forme II se séparent en une chaîne circulaire et une chaîne linéaire qui ont maintenant des coefficients de sédimentation de 18 S et de 16 S. Dans les mêmes conditions, les deux chaînes de la forme I ne peuvent pas se séparer (quoique toutes les liaisons hydrogènes soient rompues) et l'ADN prend la structure d'un "double-stranded cyclic coil" (52), ayant un coefficient de friction diminué et donc un coefficient de sédimentation très élevé (53 S).

L'INFECTION LYTIQUE

Le système choisi dans notre laboratoire pour étudier l'infection lytique utilise la culture primaire confluente de cellules de reins de souris (49). Dans ces cultures, la couche cellulaire est principalement formée de cellules épithéliales qui sont, pour la plupart, arrêtées dans la phase 60 du cycle mitotique. Cette situation correspond donc à celle de la cellule différenciée dans un organe intact.

Dans la cellule individuelle, l'infection lytique se déroule en deux phases:

- (1) une phase précoce, comprenant tous les événements ayant lieu avant le début de la synthèse d'ADN (cellulaire et viral) induite par le virus et,
- (2) une phase tardive qui comprend les événements ayant lieu après le début de la synthèse de l'ADN.

1. La phase précoce

Peu après la pénétration du virus dans la cellule, on observe dans le noyau de la cellule hôte, la transcription d'ARN viral précoce (50), suivie de l'apparition de l'antigène T intranucléaire dans toutes les cellules de la culture (20, 41, 51). La structure et la fonction de cet antigène ne sont pas encore connues, mais une série d'observations suggère que sa fonction pourrait être d'induire la réplication de la chromatine cellulaire (21, 33).

Cette réplication semble être une condition nécessaire pour la réplication de l'ADN viral. La durée très variable de la phase précoce (12 à 30 heures à 37°) dans les cellules individuelles est responsable de l'asynchronie marquée de l'infection observée dans ces cultures (51).

2. La phase tardive

Par suite de l'asynchronie de l'infection, la synthèse d'ADN (cellulaire et viral) induite par le virus commence dans les premières cellules vers 12 heures après l'infection mais atteint le maximum seulement vers 25 à 30 heures après l'infection (51).

La réplication de l'ADN chromosomique induite par le polyome est accompagnée de la synthèse d'histones et d'autres protéines de la chromatine cellulaire (21, 48). L'infection par le polyome aboutit donc à une activation de la réplication de la chromatine cellulaire qui correspond apparemment à une phase S normale du cycle mitotique (22) avec l'exception qu'elle n'est jamais suivie d'une mitose.

L'ADN viral est répliqué, dans le noyau de la cellule hôte, parallèlement à l'ADN cellulaire. Sa réplication (voir plus bas) est accompagnée de la synthèse intranucléaire d'ARN viral tardif sous forme de molécules géantes (1, 3, 27) qui contiennent l'information nécessaire à la synthèse des protéines virales "tardives", voire des protéines structurales des capsomères (9, 23, 40). Au plus tôt six à sept heures après le début de la synthèse d'ADN, les particules virales commencent à être formées et sont ensuite libérées par la lyse de la cellule hôte.

Dans les conditions utilisées dans nos expériences (37°; haute multiplicité d'infection: environ 100 "plaque forming units" par cellule), un cycle lytique aboutit à la production d'environ 10^5 particules virales par cellule.

LA REPLICATION DE L'ADN VIRAL (voir schéma 2)

L'ADN du polyome est répliqué de façon semi-conservative (24, 25) et la structure des molécules en état de réplication correspond à celle proposée par le modèle de Cairns (5, 6). Des travaux plus récents, effectués soit avec le

polyome, soit avec son proche parent, le SV 40, tout en confirmant ces résultats (32), montrent de plus que la partie de la molécule qui n'a pas encore été répliquée conserve sa structure superhélicoïdale (2, 28, 39). Ce résultat suggère que les chaînes parentales restent fermées de façon covalente pendant toute la réplication. Mais comme il est topologiquement impossible de répliquer une molécule d'ADN circulaire et bicaténaire sans introduire, au moins temporairement, des cassures dans les chaînes parentales, on fut contraint de postuler l'existence d'un facteur capable d'introduire, de manière réversible, des cassures dans les chaînes parentales. Il est fort intéressant de noter qu'un tel facteur a été observé dans des cellules de souris et chez *E. coli* (8, 47).

La réplication est initiée à un point d'origine défini (16, 35, 43) et de là se poursuit dans deux directions (12, 16). Les nouvelles chaînes s'allongent par un mécanisme discontinu, utilisant des polynucléotides courts (poids moléculaire 50 000 daltons) comme intermédiaires (17, 31). Ces derniers sont, au moment de leur synthèse, liés de façon covalente à des ribopolynucléotides (31) qui paraissent avoir une fonction dans l'initiation de la synthèse de ces fragments. A la fin de la réplication, les deux nouvelles molécules circulaires, encore unies par les points de terminaison de la réplication, sont séparées par un mécanisme peut-être similaire à celui de la recombinaison. Les deux nouvelles molécules consistent maintenant chacune en une chaîne parentale circulaire et en une nouvelle chaîne complémentaire qui a encore une interruption au point de terminaison (15). Ces molécules sont alors transformées immédiatement en molécules superhélicoïdales.

Une caractéristique de la réplication de l'ADN viral est sa lenteur. En se basant sur la vitesse de réplication de l'ADN cellulaire (0.5 - 2 μ m par minute; 4, 26, 36, 42) l'ADN du polyome ou du SV 40, d'une longueur de 1.5 μ m, devrait être répliqué en une à trois minutes; cependant différentes méthodes montrent que le temps de réplication pour une molécule d'ADN viral doit être compris entre 5 et 15 minutes (12, 30). Cette différence peut éventuellement être expliquée soit par l'hypothèse que les mécanismes cellulaires sont moins efficaces pour la réplication de l'ADN viral que pour celle de l'ADN cellulaire, soit par une influence ralentissante de la structure tertiaire de l'ADN viral sur sa réplication.

BUT DU TRAVAIL DE THESE

Les phénomènes de la réplication de l'ADN du polyome et du SV 40 jouissent d'un intérêt toujours croissant. Les faits expérimentaux connus jusqu'à présent suggèrent comme hypothèse de travail que l'ADN viral utilise les mécanismes impliqués dans la réplication de la chromatine cellulaire pour effectuer sa propre réplication. Celle-ci est soumise, au moins en grande partie, aux mêmes systèmes de régulation que la réplication de l'ADN cellulaire qui est un phénomène encore très mal compris. La complexité structurale et fonctionnelle de la chromatine cellulaire n'a permis que des progrès lents et pénibles. Comme, en revanche, des progrès considérables ont été accomplis ces dernières années dans la compréhension de la réplication de l'ADN du polyome et du SV 40, nos expériences ont été entreprises dans l'espoir que des résultats obtenus par des études sur le mode de réplication de l'ADN du polyome pourraient être utiles à une compréhension ultérieure des mécanismes de réplication des chromosomes de la cellule mammifère. Dans ce contexte, nous avons eu comme but (1) de localiser le site de la réplication de l'ADN viral dans le noyau de la cellule hôte, et (2) d'étudier si l'ADN viral est répliqué sous forme de molécules "nues" ou plutôt sous forme de complexes nucléoprotéiques similaires à la situation qui existe pour la réplication de l'ADN chromosomique de la cellule hôte.

Résumé du résultat principal

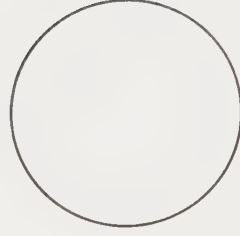
L'ADN du polyome se réplique sous forme de complexe nucléoprotéique (nucléohistone) en étroite association avec la chromatine de la cellule hôte.

Polyoma DNA I
(20 S)

Polyoma DNA II
(16 S)



pH > 12.8



(53 S)

„double stranded cyclic coil“

(18 S)

chaîne circulaire

(16 S)

chaîne circulaire

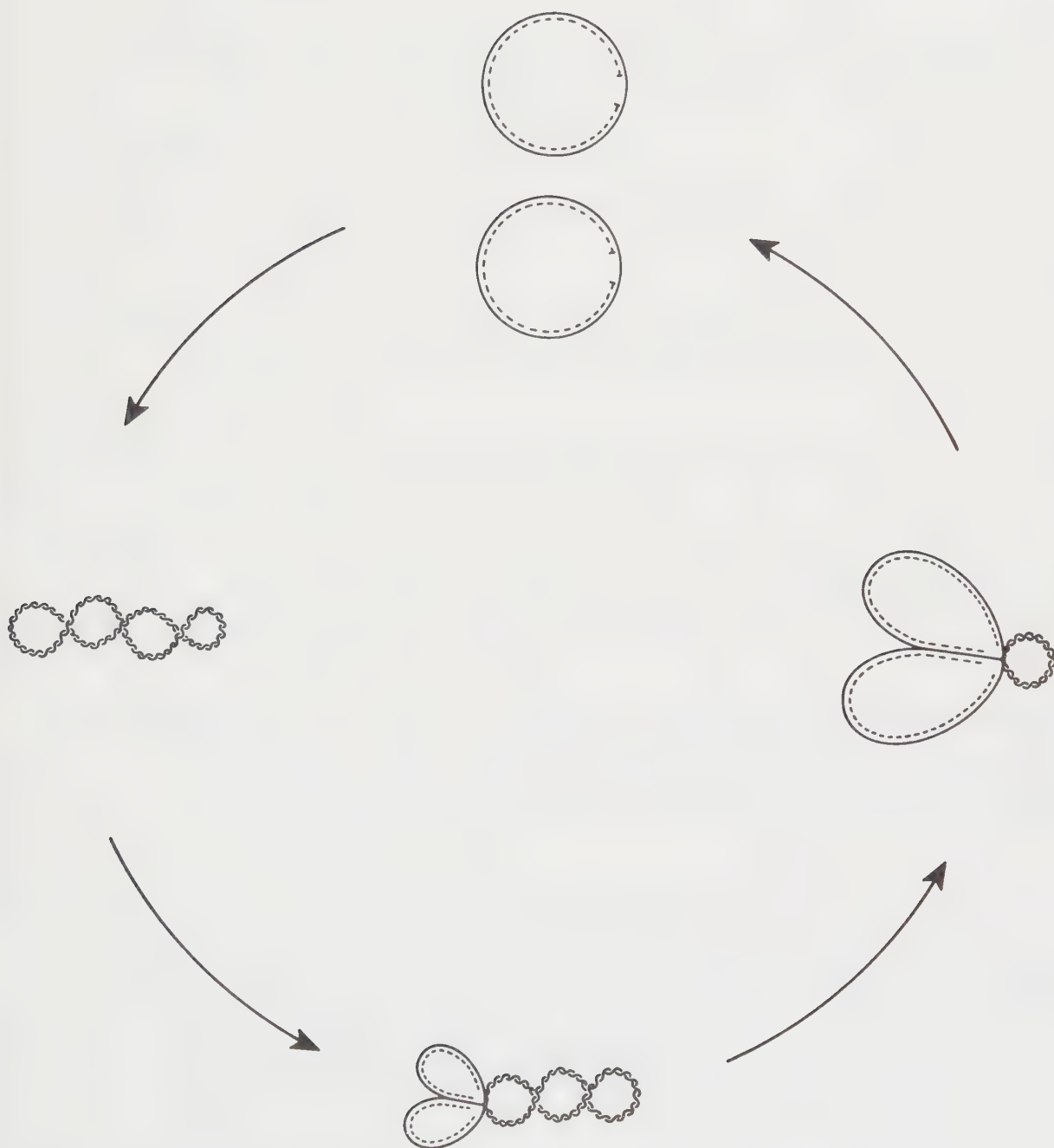


Schéma 2

LITTERATURE

1. Acheson, N., E. Buetti, K. Scherrer, and R. Weil 1971. Transcription of the polyoma virus genome : Synthesis and cleavage of giant late polyoma-specific RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68 : 2231-2235.
2. Bourgaux, P., and D. Bourgaux-Ramaoisy. 1972. Unwinding of replicating polyoma virus DNA. J. Mol. Biol. 70 : 399-415.
3. Buetti, E. 1973. en préparation.
4. Cairns, J. 1966. Autoradiography of HeLa cell DNA. J. Mol. Biol. 15 : 372-373.
5. Cairns, J. 1963. The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. J. Mol. Biol. 6 : 208-213.
6. Cairns, J. 1963. The chromosome of E. coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28 : 43-46.
7. Caspar, D.L.D., and A. Klug. 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27 : 1-24.
8. Champoux, J.J., and R. Dulbecco. 1972. An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA - a possible swivel for DNA replication. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69 : 143-146.
9. Consigli, R., et al. en préparation.
10. Crawford, L.V., R. Dulbecco, M. Fried, L. Montagnier, and M. Stoker. 1964. Cell transformation by different forms of polyoma virus DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 52 : 148-152.
11. Di Mayorca, G.A., B.E. Eddy, S.E. Stewart, W.S. Hunter, C. Friend, and A. Bendich. 1959. Isolation of infectious desoxyribonucleic acid from S.E. polyoma-infected tissue cultures. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 45 : 1805-1808.
12. Danna, K.J., and D. Nathans. 1972. Bidirectional replication of SV40 DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69 : 3097-3100.

13. Eddy, B.E. 1964. in : Progr. exp. Tumor Res. (Basel).
14. Eddy, B.E., and S.E. Stewart. 1959. Physical properties and hemagglutinating and cytopathogenic effects of the SE polyoma virus. Proc. 3d Can. Cancer Res. Conf. : 307-324.
15. Fareed, G.C., M.L. McKerlie, and N.P. Salzman. 1973. characterization of simian virus 40 DNA component II during viral DNA replication. J. Mol. Biol. 74 : 95-112.
16. Fareed, G.C., C.F. Garon, and N.P. Salzman. 1972. Origin and direction of SV40 DNA replication. J. Virol. 10 : 484-491.
17. Fareed, G.C. and N.P. Salzman. 1972. Intermediates in SV40 DNA chain growth. Nature N. Biol. 238 : 274-277.
18. Frearson, D.M., and L.V. Crawford. 1972. Polyoma virus basic proteins. J. gen. Virol. 14 : 141-155.
19. Freedmann, T., and D. Davis. 1972. Structural role of polyoma proteins. J. Virol. 10 : 776-782.
20. Fogel, M., R. Gilden, and V. Defendi. 1967. Polyoma virus induced "complement-fixing" antigen in tumors and infected cells as detected by immunofluorescence. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124 : 1047-1052.
21. Hancock, R., and R. Weil. 1969. Biochemical evidence for induction by polyoma virus of replication of the chromatin of mouse kidney cells. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 63 : 1144-1150.
22. Hancock, R. 1969. Conservation of histones in chromatin during growth and mitosis in vitro. J. Mol. Biol. 40 : 457-466.
23. Hirt, B. en préparation.
24. Hirt, B. 1969. Replicating molecules of polyoma virus. J. Mol. Biol. 40 : 141-144.
25. Hirt, B. 1966. Evidence for semiconservative replication of circular polyoma DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 55 : 997-1004.

26. Hubermann, J.A., and A.D. Riggs. 1968. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J. Mol. Biol.* 32 : 327-341.
27. Hudson, J.B., D.A. Goldstein, and R. Weil. 1970. A study on the transcription of the polyoma viral genome. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 65 : 226-233.
28. Jaenisch, R., A. Mayer, and A. Levine. 1971. Replicating SV40 molecules containing closed circular template DNA strands. *Nature N. Biol.* 233 : 72-75.
29. Klug, A., and J.T. Finch. 1965. Structure of viruses of the papilloma-polyoma type. *J. Mol. Biol.* 11 : 403-431.
30. Levine, A., H.S. Kang, and F.E. Billheimer. 1970. DNA replication in SV40 infected cells : I. Analysis of replicating SV40 DNA. *J. Mol. Biol.* 50 : 549-568.
31. Magnusson, G., V. Pigiet, E.L. Winnacker, R. Abrams, and P. Reichard. 1973. RNA-linked short DNA fragments during polyoma DNA replication. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70 : 412-415.
32. Magnusson, G., E. Winnacker, E. Eliasson, and P. Reichard. 1972. Replication of polyoma DNA in isolated nuclei. II. Evidence for semiconservative replication. *J. Mol. Biol.* 72 : 539-552.
33. May, E., P. May, and R. Weil. 1971. Analysis of the events leading to SV40-induced chromosome replication and mitosis in primary mouse kidney cell cultures. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68 : 1208-1211.
34. Michel, M.R. B. Hirt, and R. Weil. 1967. Mouse cellular DNA enclosed in polyoma viral capsids (Pseudovirions). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 58 : 1381-1388.
35. Nathans, D., and K. Danna. 1972. Specific origin in SV40 DNA replication. *Nature N. Biol.* 236 : 200-202.
36. Painter, R.B., and A.W. Schaefer. 1969. Rate of synthesis along replicons of different kinds of mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 45 : 467-479.

37. Perry, J.L., C.M. To, and R. Consigli. 1969. Alkaline degradation of polyoma virus. *J. Gen. Virol.* 4 : 403-411.
38. Roblin, R., E. Härle, and R. Dulbecco. 1971. Polyoma virus proteins. I. Multiple virion components. *Virology* 45 : 555-566.
39. Sebring, E.D., T.J. Kelly, M.M. Thoren, and N.P. Salzman. 1971. Structures of replicating SV40 DNA molecules. *J. Virol.* 8 : 478-490.
40. Seehafer, J. en préparation.
41. Takemoto, K.K., R.A. Malmgren, and K. Habel. 1966. Immuno-fluorescent demonstration of polyoma tumor antigen in lytic infection of mouse embryo cells. *Virology* 28 : 485-488.
42. Taylor, J.H. 1968. Rates of chain growth and units of replication in DNA of mammalian chromosomes. *J. Mol. Biol.* 31 : 579-594.
43. Thoren, M.M., E.D. Sebring, and N.P. Salzman. 1972. Specific initiation site for SV40 DNA replication *J. Virol.* 10 : 462-468.
44. Vasquez, C., A.K. Kleinschmidt, and C. Basilico. 1969. Electron microscopic studies of polyoma DNA released in protein monolayers. *J. Mol. Biol.* 43 : 317-325.
45. Vinograd, J., J. Lebowitz, R. Radloff, R. Watson, and P. Laipis. 1965. The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 53 : 1104-1110.
46. Vinograd, J., J. Lebowitz, and R. Watson. 1968. Early and late helix-coil transitions in closed circular DNA : the number of superhelical turns in polyoma DNA. *J. Mol. Biol.* 33 : 173-197.
47. Wang, J.C. 1971. Interaction between DNA and *Escherichia coli* protein . *J. Mol. Biol.* 55 : 523-533.
48. Winocour, E., and E. Robbins. 1970. Histone synthesis in polyoma and SV40 infected cells. *Virology* 40 : 307-315.



49. Winocour, E. 1963. Purification of polyoma virus. Virology
19 : 158-168.
50. Weil, R., and C. Salomon. en préparation.
51. Weil, R., and J. Kara. 1970. Polyoma "tumor antigen" : An
activator of chromosome replication. Proc. Nat. Acad.
Sci. U.S.A. 67 : 1011-1017.
52. Weil, R., and J. Vinograd. 1963. The cyclic helix and cyclic
coil forms of polyoma viral DNA. Proc. Nat. Acad. Sci.
U.S.A. 50 : 731-737.
53. Weil, R. 1963. The denaturation and renaturation of the DNA
of polyoma virus. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 49 :
480-487.
54. Weil, R. 1961. A quantitative assay for a subviral infective
agent related to polyoma virus. Virology 14 : 46-53.

R E S U M E D U T R A V A I L D E T H E S E

=====

L'ADN VIRAL EN ETAT DE REPLICATION EST ASSOCIE A LA CHROMATINE CELLULAIRE

La stricte corrélation chronologique entre la réplication de l'ADN cellulaire et celle de l'ADN viral dans des cultures primaires de reins de souris infectées par le polyome, ainsi que le fait que la réplication de la chromatine cellulaire est indispensable à la réplication de l'ADN viral posaient la question d'une association physique entre l'ADN viral in statu nascendi et la chromatine de la cellule hôte.

Nous avons fait l'expérience suivante pour répondre à cette question et pour voir si la réplication de l'ADN viral a lieu en association avec la chromatine ou dans le nucléoplasme de la cellule hôte: des cultures infectées ont été marquées pendant divers laps de temps (entre 5 et 30 minutes) avec de la thymidine tritiée (3H-dT) 30 heures après l'infection, moment où le nombre de cellules qui synthétisent de l'ADN a atteint son maximum. Immédiatement après le marquage, les noyaux ont été isolés et fractionnés en nucléoplasme et chromatine. Dans toutes ces expériences nous avons retrouvé 80 à 90% de la radioactivité totale (contenue dans les noyaux) dans la chromatine isolée, alors que le reste se trouvait dans le nucléoplasme. Ces expériences ont soutenu l'hypothèse que l'ADN viral est répliqué en étroite association avec la chromatine cellulaire.

ISOLEMENT DE DEUX COMPLEXES NUCLEOPROTEIQUES VIRAUX

Sachant que l'ADN viral est répliqué en étroite association avec la chromatine cellulaire, nous avons considéré deux hypothèses: (1) l'ADN viral associé à la chromatine existe sous forme de molécules "nues" ou, (2) il existe sous forme de complexes nucléoprotéiques. Il nous semblait possible, dans les deux cas, d'isoler l'ADN viral de la chromatine cellulaire en traitant cette dernière

dans des conditions qui provoquent sa dissociation partielle, libérant ainsi les molécules d'ADN viral soit nues soit sous forme de complexes nucléoprotéiques.

Les résultats décrits dans ce chapitre montrent qu'avant d'être incorporé dans les virions, l'ADN viral existe dans le noyau de la cellule infectée sous forme de complexes nucléoprotéiques étroitement associés à la chromatine cellulaire; ils peuvent en être dissociés par homogénéisation de la chromatine isolée dans un tampon de force ionique élevée (NaCl 0.5 M): un premier complexe, nommé complexe A, contient de l'ADN viral en état de réplication et un deuxième, nommé complexe B, contient de l'ADN viral mûr, (forme I).

Complexe A

Des cultures infectées ont été marquées durant 3 à 5 minutes avec de la thymidine tritiée 28 heures après l'infection. La chromatine a été isolée de ces cultures immédiatement après le marquage et ensuite homogénéisée dans un tampon contenant du NaCl 0.5 M. La partie insoluble de la chromatine a été enlevée de l'homogénat par centrifugation et le surnageant a été analysé dans des gradients de saccharose. Les résultats ont montré que la radioactivité présente dans le surnageant formait une bande distincte qui sédimentait aux environs de la position du bactériophage R 17 ajouté comme référence de sédimentation (80 S). Cette bande est formée par le complexe A.

Complexe B

Si, dans des expériences analogues, les cultures infectées étaient marquées plus longtemps que 5 minutes, une seconde bande contenant le complexe B, sédimentant plus lentement que la bande du complexe A, a été observée dans les gradients de saccharose. Après un marquage de 20 à 30 minutes, cette deuxième bande contenait 80 à 90% de la radioactivité totale présente dans les complexes A et B. Le même passage de la radioactivité du complexe A dans le

complexe B a été observé quand des cultures infectées avaient été marquées à la 3H-dT pendant 5 minutes puis incubées dans du milieu non radioactif contenant de la thymidine non marquée ("chase"). Ces résultats suggèrent une relation de précurseur à produit entre le complexe A et le complexe B.

Absence de complexes analogues dans des cellules non infectées

Pour s'assurer que les complexes décrits précédemment sont bien des complexes viraux, les contrôles suivants ont été faits. Des cultures de reins de souris confluentes, ainsi que des cultures en croissance, toutes deux non infectées, ont été marquées avec de la 3H-dT pendant 5 minutes et leur chromatine a été isolée et extraite avec du NaCl 0.5 m. Ensuite le surnageant a été analysé dans des gradients de saccharose comme auparavant. Les résultats ont montré l'absence de particules nucléoprotéiques similaires aux complexes A ou B dans la chromatine de cellules non infectées.

Expériences de reconstruction

(1) Nous avons considéré comme une source possible d'artefacts le fait que l'ADN du polyome a tendance à former, in vitro, des aggrégats avec des protéines basiques. Pour éliminer cette possibilité, nous avons ajouté de l'ADN de polyome marqué au 3H soit à des suspensions de cellules infectées avant l'isolement des noyaux, soit à des préparations de noyaux avant l'isolement de la chromatine. Les résultats de ces expériences excluent la possibilité que les complexes A et B soient des artefacts de préparation.

(2) Pour exclure la possibilité d'une association artificielle des complexes viraux à la chromatine pendant l'isolement de la chromatine, les complexes A et B radioactifs ont été mélangés à des préparations de noyaux de cellules infectées. Après isolement de la chromatine, seule une petite fraction (moins de 20%) de la radioactivité ajoutée au début est retrouvée dans la chromatine et pratiquement toute cette radioactivité résiduelle reste associée à la chromatine pendant l'homogénéisation dans du NaCl 0.5 m.

Une association artificielle des deux complexes viraux à la chromatine cellulaire pendant l'isolement de cette dernière est donc peu probable.

Caractérisation de l'ADN du complexe A

Nous avons préparé, à partir de cultures infectées, du complexe A marqué à la 3H-dT et nous en avons extrait l'ADN. Cet ADN a été mélangé à un ADN de référence qui était de l'ADN du polyome marqué au 14C, extrait de virions purifiés. L'ADN du complexe A a ensuite été analysé par différentes techniques telles que la sédimentation dans des solutions neutres de CsCl, la sédimentation dans des gradients de saccharose neutres ou alcalins et la centrifugation à équilibre dans des gradients de densité de CsCl en présence ou absence de bromure d'ethidium ainsi que par hybridation de l'ADN radioactif du complexe A avec de l'ADN du polyome extrait de virions purifiés. Les résultats obtenus ont montré que l'ADN du complexe A consiste en molécules d'ADN de polyome en état de réplication et ils ont exclu la présence d'ADN cellulaire.

Caractérisation de l'ADN du complexe B

L'ADN extrait du complexe B a été analysé de la même manière que l'ADN du complexe A. Les résultats de ces expériences ont montré que l'ADN du complexe B consiste uniquement en ADN du polyome mûr sous la forme I.

Les complexes A et B sont des nucléoprotéines

Le fait que l'ADN peut être extrait quantitativement du complexe A ou B en utilisant des détergents ou des solutions de haute force ionique (p. ex. 7.5 m CsCl) indique que les deux complexes sont des nucléoprotéines. Pour obtenir plus d'information sur ce point, nous avons traité des préparations de complexe A et B avec de la formaldehyde.

Ce procédé lie les acides nucléiques et les protéines de façon covalente et permet ainsi d'analyser la densité de tels complexes dans des gradients de CsCl.

Cette analyse a montré que les complexes A et B ont la même densité de 1.470 g/cm^3 . Cette densité est légèrement plus élevée que celle de la chromatine cellulaire extraite et analysée dans les mêmes conditions expérimentales (1.380 g/cm^3).

Nous avons conclu de ces analyses que les complexes A et B sont des complexes nucléoprotéiques avec le même rapport ADN/protéines supérieur à celui de la chromatine cellulaire.

Le rapport ADN/protéines ne change pas pendant la répllication
de l'ADN du polyome

Le complexe A forme, dans des gradients de saccharose, une bande relativement large. Pour répondre à la question de savoir si cette largeur de bande est l'expression d'une hétérogénéité structurale des différentes particules du complexe A, nous avons fait l'expérience suivante: la bande formée par le complexe A dans un gradient de saccharose a été divisée en trois fractions:

(1) la fraction qui sédimentait le plus vite, (2) le centre de la bande et, (3) la fraction qui sédimentait le plus lentement. D'un échantillon de chacune de ces trois fractions, l'ADN a été extrait et analysé dans des gradients de CsCl contenant du bromure d'ethidium. Les résultats ont montré que les particules du complexe A qui sédi-
mentaient le plus vite étaient celles qui contenaient l'ADN dont la répllication était la plus avancée, c'est-à-dire qu'ils conte-
naient presque deux molécules d'ADN. La fraction la plus lente contenait, en revanche, l'ADN dont la répllication n'était qu'au début, alors que le centre de la bande du complexe A contenait 1 ADN dont la répllication était en état intermédiaire.

D'autres échantillons de ces trois fractions furent traités à la formaldehyde et leurs densités analysées dans des gradients de CsCl. Les résultats ont montré que les trois fractions avaient la même densité de 1.470 g/cm^3 , bien que les complexes prélevés dans ces trois fractions contiennent des quantités d'ADN très différentes.

Ces résultats indiquent que le même rapport ADN/protéines est maintenu pendant toute la réplication d'une molécule d'ADN du polyome, ce qui suggère que les sections d'ADN nouvellement répliquées sont immédiatement complexées avec des protéines.

Analyse des protéines des complexes A et B

Pour obtenir de l'information sur les protéines présentes dans les complexes A et B, nous avons marqué des cultures 28 heures après l'infection par des pulses de divers laps de temps (30 minutes à 3 heures) d'acides aminés radioactifs (^{14}C). Nous avons isolé les deux complexes viraux puis analysé leurs protéines (marquées au ^{14}C) dans des plaques de gel de polyacrylamide en présence de sodium-dodecylsulfate. Les positions des différentes chaînes polypeptidiques ont été déterminées par coloration et ensuite par autoradiographie. Les résultats ont montré que les complexes A et B contiennent les quatre mêmes protéines et que celles-ci se comportent comme les quatre petites protéines qui se trouvent à l'intérieur de virions purifiés et qui sont des histones cellulaires (PV IV - VII). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que les sections de l'ADN du polyome nouvellement répliquées sont immédiatement complexées avec des histones cellulaires.

D I S C U S S I O N

=====

Il nous a été possible d'isoler, à partir de cultures de reins de souris infectées par le polyome, deux complexes nucléoprotéiques spécifiques pour le virus et qui ont été appelés complexe A et complexe B. Quoique ces deux complexes restent associés à la chromatine cellulaire pendant l'isolement de celle-ci, ils peuvent en être dissociés par homogénéisation dans un tampon contenant du NaCl 0.5 m. Les résultats obtenus jusqu'ici excluent la possibilité que les deux complexes eux-mêmes, ainsi que leur association à la chromatine cellulaire, soient des artefacts expérimentaux.

L'analyse de l'ADN présent dans les deux complexes a montré (1) que tous deux ne contiennent que de l'ADN de polyome, (2) que le complexe A ne contient que de l'ADN du polyome en état de réplication et enfin, (3) que le complexe B ne contient que de l'ADN du polyome mûr sous la forme I.

Nos résultats ont montré de plus que les complexes A et B sont des nucléoprotéines ayant la même densité de 1.470 g/cm^3 et ainsi le même rapport ADN/protéines. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que les sections de l'ADN du polyome nouvellement répliquées sont immédiatement complexées avec des protéines et que, par conséquent, le rapport ADN/protéines reste constant pendant toute la réplication d'une molécule d'ADN du polyome. Dans ce contexte il est utile de se rappeler qu'un rapport spécifique ADN/protéines est aussi maintenu pendant la réplication de la chromatine de la cellule mammifère.

D'autres expériences ont montré que les protéines contenues dans les complexes A et B se comportent, en gels de polyacrylamide, comme les quatre petites protéines qu'on retrouve à l'intérieur des virions purifiés (protéines IV - VII). Il a été démontré que celles-ci représentent des histones cellulaires qui ont été synthétisées pendant la réplication de la chromatine cellulaire induite par le polyome. Cela nous mène à l'hypothèse que l'ADN du polyome,

pendant sa réplication, est immédiatement complexé avec des histones cellulaires nouvellement synthétisées et que le complexe B, après avoir été enveloppé par les capsomères viraux (composés des protéines virales I, II et III), devient le "noyau" des virions de la progéniture. La réplication de la chromatine cellulaire paraît ainsi nécessaire pour fournir des histones à l'ADN viral en état de réplication.

Nous basant sur les données expérimentales connues actuellement, nous proposons l'hypothèse de travail que l'ADN du polyome se comporte comme un "replicon" chromosomique simplifié. Nous espérons que les études sur le mode de réplication de l'ADN du polyome fourniront des informations sur le rôle que pourraient jouer les histones dans la réplication de la chromatine des cellules mammifères.

